

基于Nrf2/HO-1信号通路介导的铁死亡探讨 补阳还五汤对脊髓损伤的保护作用

钱煜昊¹, 卜献忠², 郭晓辉³, 李寒曦³, 王奕鑫⁴, 王子奇⁵, 卜保献^{3*}

(1. 北京中医药大学东直门医院洛阳医院(洛阳市中医院), 河南 洛阳 471000;

2. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450046;

3. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院), 河南 洛阳 471000;

4. 宁夏中医研究院, 银川 750021;

5. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 基于核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)通路介导的铁死亡探讨补阳还五汤对脊髓损伤(SCI)后铁死亡相关蛋白的影响, 并揭示补阳还五汤保护SCI的分子作用机制。方法: 96只SPF级雄性大鼠, 随机分为假手术组、模型组、莱菔硫烷组、补阳还五汤组, 除假手术组外, 其余3组均采用改良Allen's法构建T₉~T₁₀节段SCI大鼠模型。假手术组、模型组则予生理盐水(15 mL·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃, 补阳还五汤组予补阳还五汤水煎液灌胃(14.9 g·kg⁻¹·d⁻¹), 莱菔硫烷组予莱菔硫烷腹腔注(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 在造模成功后分别予对应处理7、14 d; 在造模成功及干预7、14 d后, 采用Basso Beattie Bresnahan(BBB)评分、斜板评分、苏木素-伊红(HE)染色、免疫组化法(IHC)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR), 观察补阳还五汤对不同时间段SCI大鼠模型下肢运动功能、脊髓前角区神经元的形态结构及Nrf2/HO-1铁死亡信号通路蛋白和mRNA的影响。结果: ①与假手术组比较, 干预7、14 d后, 模型组大鼠下肢BBB运动评分及斜板试验倾斜角度明显降低($P<0.05$); 细胞结构破坏, 细胞核固缩, 大部分核仁、核膜消失, 组织结构散乱, 较多脊髓空洞, 炎性细胞浸润严重; 生长相关蛋白-43(GAP-43)、神经丝蛋白200(NF200)阳性细胞数明显降低($P<0.05$); 总铁离子和丙二醛(MDA)含量显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)与Nrf2、HO-1的蛋白和mRNA均显著降低, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。②与模型组比较, 干预7、14 d后, 莱菔硫烷组、补阳还五汤组的大鼠下肢BBB运动评分及斜板试验倾斜角度均显著升高($P<0.01$); 两组细胞结构相对完整、神经元肿胀减轻, 组织空洞和细胞坏死减少; GAP-43、NF200阳性细胞数均明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 干预7 d后, 莱菔硫烷组总铁离子含量显著降低、GPX4含量显著升高($P<0.01$), Nrf2、HO-1的蛋白及mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), 补阳还五汤组总铁离子和GPX4含量, Nrf2、HO-1蛋白及Nrf2 mRNA表达差异无统计学意义, HO-1 mRNA表达明显上调($P<0.05$), 干预14 d后两组总铁离子及MDA含量均显著降低($P<0.01$), GPX4、GSH、SOD含量显著升高($P<0.01$), Nrf2、HO-1蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$)。③与莱菔硫烷组比较, 补阳还五汤组大鼠干预7、14 d后BBB运动评分及斜板试验倾斜角度差异均无统计学意义; 补阳还五汤组神经元细胞间隙大部分正常, 见少量形态不规则、结构相对完整、肿胀较轻的神经元细胞, 组织空洞和细胞坏死减少; 两组的GAP-43、NF200阳性细胞数及总铁离子、GPX4、GSH、SOD、MDA表达差异均无统计学意义; 干预7 d后Nrf2蛋白表达差异无统计学意义, HO-1蛋白表达明显下调, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 干预14 d后Nrf2、HO-1蛋白表达明显下调($P<0.05$), 干预7 d后Nrf2 mRNA表达差异无统计学意义, 干预7 d后HO-1及干预14 d后Nrf2、HO-1的mRNA表达明显下调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论: 补阳还五汤具有调控Nrf2/HO-1信号通路和抑制SCI后铁死亡的作用, 对改善SCI大鼠下肢运动功能障碍、促进SCI后脊髓神经细胞轴突再生具有一定帮助, 这可能是补阳还五汤对SCI的保护作用机制之一。

[关键词] 脊髓损伤; 铁死亡; 补阳还五汤; 核因子E₂相关因子2; 血红素加氧酶-1

[中图分类号] R242; R744; R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)15-0067-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252391

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250808.1743.007>

[网络出版日期] 2025-08-11 10:15:51



[收稿日期] 2025-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82405439); 洛阳市中医重点学科(中西医结合医学-脊柱外科)(洛卫科教[2022]5号)

[第一作者] 钱煜昊, 硕士, 住院医师, 从事脊柱相关疾病的中医诊治, E-mail: 471359378@qq.com

[通信作者] * 卜保献, 博士, 主任医师, 从事脊柱相关疾病的中医诊治, E-mail: bbx2137@163.com

Protective Effect of Buyang Huanwutang Against Spinal Cord Injury Based on Ferroptosis Mediated by Nrf2/HO-1 Signaling Pathway

QIAN Yuhao¹, BU Xianzhong², GUO Xiaohui³, LI Hanxi³, WANG Yixin⁴, WANG Ziqi⁵, BU Baoxian^{3*}

(1. Luoyang Branch of Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine (Luoyang Hospital of Traditional Chinese Medicine), Luoyang 471000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

3. Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province (Henan Orthopedic Hospital), Luoyang 471000, China; 4. Ningxia Institute of Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750021, China;

5. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Buyang Huanwutang (BYHWD) on ferroptosis-related proteins after spinal cord injury (SCI) through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway-mediated ferroptosis, and to elucidate the molecular mechanisms underlying the protective effects of BYHWD against SCI. **Methods:** Ninety-six SPF male rats were randomly assigned to a sham-operated group, model group, sulforaphane (SFN) group, and BYHWD group. Except for the sham-operated group, the SCI model at the T₉-T₁₀ segment was established using the modified Allen's method. The sham-operated and model groups received normal saline (15 mL·kg⁻¹·d⁻¹) by gavage, the BYHWD group received BYHWD decoction (14.9 g·kg⁻¹·d⁻¹) by gavage, and the SFN group received intraperitoneal injection of SFN (50 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Following successful model establishment, the corresponding treatments were administered for 7 or 14 days. After SCI induction and after 7 and 14 days of intervention, Basso Beattie Bresnahan (BBB) locomotor scoring, inclined plane testing, hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemistry (IHC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, and real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were performed to evaluate hindlimb motor function, morphological changes of neurons in the anterior horn of the spinal cord, and the expression of proteins and genes involved in the Nrf2/HO-1 ferroptosis signaling pathway. **Results:** ① Compared with the sham-operated group, the model groups showed significantly decreased BBB locomotor scores and inclined plane angles after 7 and 14 days of intervention ($P<0.05$). Cellular structures were disrupted, nuclei were pyknotic, and most nucleoli and nuclear membranes disappeared. Tissue architecture became disorganized, spinal cord cavities increased, and inflammatory cell infiltration was severe. The numbers of GAP-43- and NF200-positive cells were significantly reduced ($P<0.05$). Iron ion and malondialdehyde (MDA) levels were significantly increased ($P<0.01$), whereas glutathione peroxidase 4 (GPX4), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and the protein and mRNA expression levels of Nrf2 and HO-1 were significantly decreased ($P<0.01$). ② Compared with the model group, the SFN and BYHWD groups exhibited significantly increased BBB locomotor scores and inclined plane angles at both time points ($P<0.01$). In both groups, cellular structures were relatively intact, neuronal swelling was alleviated, and tissue cavitation and cell necrosis were reduced. The numbers of GAP-43- and NF200-positive cells were significantly increased ($P<0.05$). After 7 days of intervention, the SFN group showed significantly reduced iron ion levels and increased GPX4 levels ($P<0.01$), accompanied by significantly increased protein and mRNA expression of Nrf2 and HO-1 ($P<0.05$, $P<0.01$). In the BYHWD group, changes in iron ion and GPX4 levels were not statistically significant. The protein expression of Nrf2 and HO-1 and the mRNA expression of Nrf2 also showed no significant differences, whereas HO-1 mRNA expression was significantly upregulated ($P<0.05$). After 14 days of intervention, both groups exhibited significantly decreased iron ion and MDA levels ($P<0.01$), significantly increased GPX4, GSH, and SOD levels ($P<0.01$), and significantly elevated protein and mRNA expression of Nrf2 and HO-1 ($P<0.01$). ③ Compared with the SFN group, the BYHWD group showed no significant differences in BBB locomotor scores or inclined plane angles at either time point. Most neuronal intercellular spaces appeared normal, with only a small number of neurons exhibiting irregular morphology, relatively intact structures, and mild swelling. Tissue cavitation and cell necrosis were reduced. No significant differences were observed between the two groups in the numbers of GAP-43- and NF200-positive cells or in the levels of iron ions, GPX4, GSH, SOD, and MDA at either time point. After 7 days of intervention, no significant difference was found in Nrf2 protein expression, whereas HO-1 protein expression was significantly downregulated ($P<0.05$). After 14 days of intervention, the protein expression of both Nrf2 and HO-1 was significantly downregulated ($P<0.05$). Similarly, no significant difference was observed in Nrf2 mRNA expression after 7 days of intervention, whereas HO-1 mRNA expression after 7 days and Nrf2 and HO-1 mRNA expression after 14 days were significantly downregulated ($P<0.05$). **Conclusion:** BYHWD can regulate the Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibit ferroptosis after SCI. It contributes to the improvement of hindlimb motor dysfunction and promotes axonal regeneration of spinal neurons after SCI, which may represent one of the mechanisms underlying its protective effects against SCI.

[Keywords] spinal cord injury; ferroptosis; Buyang Huanwutang; nuclear factor E₂-related factor 2; heme oxygenase-1

脊髓损伤(SCI)是一种中枢神经发生损伤的脊柱疾病,可造成人体运动、感觉和自主神经系统功能障碍,有极高的致残率和死亡率^[1]。全球疾病、伤害和危险因素负担(GBD)进行的一项流行病学研究报告称,2019年全球有2 060万[95%不确定区间(95%UI) 18.9~23.6]SCI患者,新发病例数为91万(95%UI 0.7~1.2)^[2]。我国每年共有SCI患者759 302例,新增病例66 374例,这给患者家庭和社会带来沉重的负担^[3]。SCI分为原发性和继发性2个阶段,前者是指机械性损伤直接破坏组织和细胞,造成脊髓局部微循环受损,导致局部出血及坏死,目前研究认为原发性损伤是不可逆的^[4]。继发性损伤发生于前者基础之上,其过程主要出现炎症反应、氧自由基形成、脂质过氧化和细胞程序性死亡等,继发性损伤持续时间久,病灶面积逐渐扩大,对神经的危害程度已经超过原发性损伤^[5]。

铁死亡是一种新型程序性细胞死亡方式,由不受限制的脂质过氧化(LPO)和质膜破裂引起^[6]。铁死亡形态学特征主要表现为线粒体水肿、膜密度增大、内嵴减少或缺失及质膜破裂,生化特征主要表现为总铁离子和活性氧(ROS)超载^[7-8]。SCI发生后脊髓内大量出血,红细胞破裂释放大量总铁离子,损伤部位出现铁超载;同时脊髓含有高含量的多不饱和脂肪酸,SCI应激反应后的LPO使ROS超载,亦会导致这一病理变化,最终发生铁死亡^[9]。谷胱甘肽(GSH)是细胞内重要的抗氧化酶,其水平降低会加剧氧化损伤和炎症反应,超氧化物歧化酶(SOD)功能与GSH相似,是一种可清除超氧阴离子自由基的抗氧化酶,丙二醛(MDA)是脂质氧化的主要产物,而GSH、SOD和MDA被认为是氧化反应的重要标志物^[10-12]。研究表明,核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路是调节铁死亡的关键通路之一^[13]。莱菔硫烷是一种从十字花科植物中提取出来的有机硫化合物,具有抗炎、抗肿瘤及抗氧化作用,可作为Nrf2的激动剂,激活其下游抗氧化基因,上调Nrf2的表达,具有潜在的神经保护作用^[14],BENEDICT等^[15]研究证明SCI发生后立刻给药可起到一定神经保护作用,故采取莱菔硫烷作为本实验对照组试剂。

清代王清任所著的《医林改错·下卷·瘫痿论》首次记载补阳还五汤^[16],该方由黄芪、赤芍、川芎、当归尾、地龙、桃仁、红花组成,诸药合用有补气活血通络之功,其中黄芪甲苷、槲皮素、木犀草素、山柰酚、异鼠李素是补阳还五汤治疗SCI的关键有效

成分^[17]。课题组前期研究发现,补阳还五汤通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路可激活SCI神经细胞自噬,改善大鼠下肢运动功能^[18]。近年来,学界内对补阳还五汤-脊髓损伤-铁死亡的网络药理学研究表明,黄芪与谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)、白细胞介素-6(IL-6)、前列腺素内过氧化物合成酶2(PTGS2)等治疗SCI的关键基因高度相关,可抑制铁死亡并保护神经细胞^[19]。黄芪是补阳还五汤的君药,用量达120 g/剂,且另有研究表明,补阳还五汤可通过调控Nrf2/HO-1/GPX4信号通路以影响铁死亡,减轻大鼠脑缺血损伤^[20]。笔者推测补阳还五汤治疗SCI的机制或许是通过调控上述相关信号通路实现的,故开展本研究,拟基于Nrf2/HO-1信号通路,探讨补阳还五汤对SCI大鼠模型的铁死亡表型特征影响,揭示其调控铁死亡以保护SCI的分子作用机制。

1 材料

1.1 实验动物及分组 SPF级雄性SD大鼠96只,6~8周龄,体质量180~220 g,购买自郑州大学实验动物中心(河南省实验动物中心),许可证号SCXK(豫)2022-0001。将96只大鼠随机编号,并适应性饲养7 d后,随机分为假手术组、模型组、莱菔硫烷组和补阳还五汤组,每组24只,再分7、14 d 2个亚组,每组12只;假手术组仅暴露脊髓,不打击损伤处理,其余各组均采用改良Allen's法^[21]制备T₉₋₁₀节段SCI大鼠模型。各组实验动物均自然条件下常规进食、饮水,严格分笼喂养。

1.2 伦理 实验相关操作方法严格遵守科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》执行。研究方案经郑州大学动物伦理委员会批准,审批号ZZU-LAC20231027[01]。

1.3 试剂 莱菔硫烷(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批次/序列号码A2215032,纯度>98%),大鼠GPX4酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海爱萌优宁生物技术有限公司,批号LV20958);总铁离子比色法测试盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-BC-K772-M);蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(意大利Gbs公司,批号G3522-3);MDA、还原型GSH、SOD比色法测试盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为E-BC-K025-M、E-BC-K030-M、E-BC-K020-M);大鼠单抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号IPVH00010);兔单抗HO-1

(美国 CST 公司, 批号 43966T); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 (碧云天生物技术有限公司, 批号 A0208); 兔多抗 Nrf2、HRP 标记羊抗小鼠二抗、兔多抗生长相关蛋白-43 (GAP-43)、兔多抗神经丝蛋白 200 (NF200) (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为 16396-1-AP、SA00001-1、16971-1-AP、18934-1-AP)。

1.4 仪器 RM 2016 型轮转式病理切片机 (德国 Leica 公司); Flexstation 3 型多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); HI-16KR 型台式高速冷冻离心机 (湖南可成仪器公司); BX53 型生物显微镜 (日本奥林巴斯公司); WD-9413B 型凝胶成像分析仪、OYY-6C 型电泳仪 (北京久一仪器公司); ND-100 型超微量紫外可见分光光度计 (杭州米欧仪器有限公司); ViiA-7 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪、proFlex 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (美国 ABI 公司); WIX-easyPRO4 型垂直电泳槽 [韦克斯科技 (北京) 有限公司]; FW606 型半干转印仪 (南京艾思易公司); ZH-ZYQ 型自由落体脊髓损伤模型打击器 (安徽正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 实验药物制备 补阳还五汤组成为生黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 5 g、川芎 3 g、地龙 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g, 合计 143 g, 以上药物均由河南省洛阳市张仲景大药房提供, 生产批号分别为 LQ224250307、220106389、2303005、VT285241205、220210、23250309、ZK233904, 经刘冰主任药师鉴定均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》要求。沿用本课题组前期研究的煎煮方法和药物浓度: 取一剂药与 10 倍药物体积的纯净水放入煎药砂锅中, 浸泡 1~2 h, 煮沸后小火继续煮 30 min, 将药液滤出; 再加入 5 倍药物体积的纯净水, 按上述方法再次煎药, 滤出药液。将 2 次滤出的药液混合, 再次过滤, 浓缩定容至 100 mL, 最终获得质量浓度为 $1.43 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的补阳还五汤水煎液^[18]。莱菔硫烷与 10 倍体积的玉米油混合^[15], 制为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤除去细菌。

2.2 复制 SCI 大鼠模型 模型组、莱菔硫烷组、补阳还五汤组均采用 4% 异氟烷快速诱导麻醉, 轻夹大鼠的四趾脚趾, 若大鼠无任何反应, 则判断大鼠进入深度麻醉状态。麻醉成功后, 2% 异氟烷维持麻醉, 常规消毒铺巾, 采用改良 Allen's 法^[21]制备 $T_9 \sim T_{10}$ 节段 SCI 大鼠模型。以大鼠 $T_9 \sim T_{10}$ 为中心作 3 cm 纵向切口, 切开皮下组织, 暴露 $T_9 \sim T_{10}$ 锥体, 咬

除棘突和椎板, 暴露脊髓, 采用 10 g 重物从 2.5 cm 高度自由落下打击 $T_9 \sim T_{10}$ 硬脊膜; 造模成功标准为受打击脊髓组织局部水肿、出血, 硬脊膜完整, 呈紫红色、紧张、膨隆, 大鼠尾巴出现痉挛性摆动, 双下肢躯体回缩样扑动, 呈迟缓性瘫痪^[18]。打击脊髓后用生理盐水、庆大霉素冲洗伤口后逐层缝合, 覆盖敷料, 腹腔注射青霉素 ($10\,000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 共 7 d。

2.3 动物给药 参考黄继汉《药理实验中动物间和动物和人体间的等效剂量换算》^[22], 成人用补阳还五汤剂量为 $143 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 换算后大鼠的灌胃剂量为 $12.73 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 假手术组、模型组于造模后第 2 天予以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 生理盐水等体积灌胃; 补阳还五汤组则造模成功后予以 $12.73 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的中药水煎液灌胃; 莱菔硫烷组则给予莱菔硫烷 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 腹腔注射^[15]; 每组分 7、14 d 2 个亚组, 均分别干预 7、14 d。

2.4 组织取材 每组随机选取 6 只大鼠取新鲜脊髓组织, 采用上述麻醉方法对各组实验大鼠进行麻醉, 麻醉生效后采用剪刀打开胸腔, 暴露心尖位置, 采血针采取血液 5 mL, 而后灌注生理盐水 300~500 mL, 待血液置换完成后, 以 T_{10} 为中心切取 1 cm 新鲜的脊髓组织; 或待血液置换完成后, 采用 10% 甲醛灌注直至四肢、尾巴僵硬, 切取 1 cm 固定的脊髓组织。

2.5 观察指标及检测方法

2.5.1 BBB 运动功能评分及斜板试验测试 采用盲法对各组大鼠进行 BBB^[23]、斜板试验^[24]评分。采用双盲、双人独立观察并记录, 取平均值。BBB 评分主要包含大鼠后肢关节活动范围、协调能力、爪子的精细运动情况, 0 分则大鼠完全瘫痪, 21 分则大鼠正常活动, 分数越高则大鼠运动能力越好。斜板试验: 大鼠身体纵轴与倾斜板纵轴垂直放置于长方形木板上, 然后逐渐增加倾斜角, 并大鼠在位置上保持 5 s 不动时, 记录各组大鼠倾斜平面临界角度, 取平均值。

2.5.2 苏木素-伊红 (HE) 染色及免疫组织化学检测

HE 染色: 石蜡浸蜡包埋、切片、烘片, 切片 $5 \mu\text{m}$; 切片经二甲苯、无水乙醇、梯度乙醇中脱蜡, 依次苏木素液染色、1% 盐酸-乙醇分化、水洗, 再伊红染色、水洗、梯度乙醇中脱水, 二甲苯中透明, 烘片、中性胶封片, 光学显微镜观察脊髓损伤区形态。

免疫组织化学检测: 切片、脱蜡、脱水等过程同前, 枸橼酸盐高压修复、 H_2O_2 清除内源性过氧化物酶、清洗、牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 加入一抗

(GAP-43 1:200, NF200 1:200)4 °C过夜、清洗,滴加HRP标记的K5700即用型二抗,孵育、清洗,滴加二氨基联苯胺(DAB)显影剂、清洗,苏木素染色、清洗,脱水、封片、光学显微镜下镜检;蓝色为细胞核,棕黄色或棕褐色为目标蛋白。

2.5.3 ELISA检测血液中总铁离子和脊髓组织中GSH、SOD、MDA、GPX4的表达 各组样品4 °C 3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径15 cm,下同),取上清-80 °C分装冻存。根据厂家说明书,使用ELISA试剂盒进行双抗体夹心法检测及酶标仪在规定的波长处(总铁离子593 nm、GSH 405 nm、SOD 450 nm、MDA 532 nm、GPX4 450 nm)检测吸光度A,计算在样本中的含量。

2.5.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脊髓组织损伤区域Nrf2、HO-1的蛋白表达 每只大鼠取30 mg脊髓组织,在冰上研磨成呈粉末状,加入裂解液,震荡混匀,离心(12 000 r·min⁻¹, 5 min),测定蛋白样品总浓度。制备制备电泳胶、上样、电泳分离,转移蛋白样品至聚偏二氟乙烯(PVDF)上,用含5%脱脂奶粉的TBST浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2 h,加入一抗或内参孵育液中(β -actin 1:5 000, Nrf2 1:4 000, HO-1 1:1 000),孵育后洗涤蛋白样品,加入HRP标记二抗(1:10 000),室温摇床封闭2 h,增强化学发光法(ECL)液显色,显色曝光,冲洗胶片,晾干胶片,扫描胶片,采用Image J软件观察条带灰度值并分析蛋白表达情况。

2.5.5 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测脊髓组织损伤区域Nrf2、HO-1的mRNA表达 取30 mg脊髓组织,冰上研磨匀浆,TRIzol法提取样本RNA及测定其浓度,逆转录成cDNA,以此作为模板配置PCR反应体系,行Real-time PCR分析,反应条件:95 °C预变性60 s;95 °C变性30 s,60 °C退火45 s,72 °C延伸15 s,40个循环。根据2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算mRNA相对表达量。引物由擎科生物(中国北京)合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	下游 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
Nrf2	上游 CCCATTGAGGGCTGTGAT	247
	下游 TTGGCTGTGCTTTAGGTC	
HO-1	上游 GCATGTCACAGGATTGTCC	192
	下游 GGTTCGCTTGTTCGCTCT	

2.5.6 统计学处理 运用SPSS 22.0软件相关数据进行分析;正态分布定量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示;多组间数据满足正态性及方差齐性则运用单因素方差分析,组间两两比较则采用最小显著性差异法(LSD)检验;不满足方差齐性,则采用Tamhane T2分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组大鼠行为的影响 与假手术比较,干预7 d后,模型组大鼠下肢BBB运动评分均显著降低($P<0.01$),斜板试验倾斜角度显著降低($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组、莱菔硫烷组大鼠下肢BBB运动评分显著升高($P<0.01$),斜板试验倾斜角度明显增大;与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组大鼠下肢BBB运动评分、斜板试验倾斜角度均差异无统计学意义。

与假手术比较,干预14 d后,模型组大鼠下肢BBB运动评分均显著降低($P<0.01$),斜板试验倾斜角度显著降低($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组、莱菔硫烷组大鼠下肢BBB运动评分显著升高($P<0.01$),斜板试验倾斜角度明显增大;与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组大鼠下肢BBB运动评分、斜板试验倾斜角度均差异无统计学意义。见表2。

表2 补阳还五汤对大鼠在造模后不同时间点行为学评分的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwutang on behavioral scores of rats at different time points after modeling($\bar{x}\pm s, n=9$)

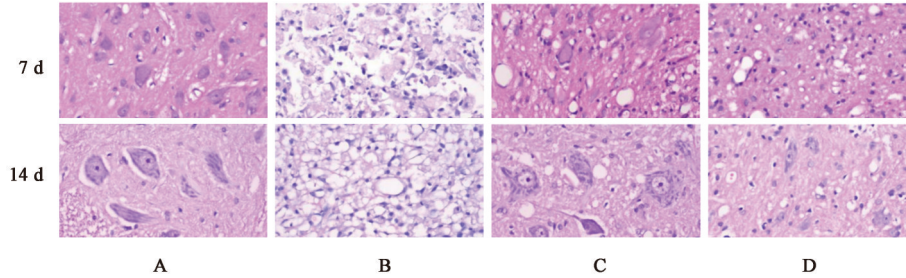
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	时间 /d	BBB运动评分 /分	斜板试验倾斜 角度/°
假手术组		7	19.89±0.93	57.45±1.79
		14	20.22±0.97	54.44±2.99
模型组		7	3.22±1.20 ²⁾	14.73±1.82 ²⁾
		14	7.56±1.42 ²⁾	16.75±1.37 ²⁾
莱菔硫烷组	50	7	5.67±0.71 ⁴⁾	26.08±2.12 ⁴⁾
		14	15.33±1.50 ⁴⁾	42.86±3.76 ⁴⁾
补阳还五汤组	12.73	7	5.33±0.87 ⁴⁾	24.37±1.05 ⁴⁾
		14	14.44±1.42 ⁴⁾	41.46±1.65 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;模型组治疗后同时时间点比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与莱菔硫烷组治疗后同时时间点比较⁵⁾ $P<0.05$ (表3-表7同)

3.2 对各组大鼠脊髓病理学的影响 造模后7、14 d,假手术组神经元细胞结构完整性较完整,细胞间隙正常,核仁、核膜明显清晰,未见肿胀、坏死神经元细胞分布;模型组神经元细胞肿胀严重,结构破坏,细胞核固缩,大部分核仁、核膜消失,组织结

构散乱,有较多脊髓空洞存在和炎性细胞浸润;莱菔硫烷组可见形态结构相对正常的神经元细胞,细胞间隙正常,有轻微肿胀和少量组织空洞存在;补

阳还五汤组可见少量形态不规则、结构相对完整、肿胀较轻的神经元细胞,组织空洞和细胞坏死减少。见图1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.莱菔硫烷组;D.补阳还五汤组(图2同)

图1 补阳还五汤对大鼠脊髓神经细胞组织形态学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang on morphological of spinal cord nerve cells in rats (HE,×400)

3.3 对脊髓损伤区域 GAP-43、NF200 阳性细胞表达的影响 与假手术组比较,干预7 d后,模型组 GAP-43 阳性细胞数明显下调($P<0.05$),NF200 阳性细胞数显著下调($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组、补阳还五汤组 GAP-43 阳性细胞数均显著上调($P<0.01$),两组 NF200 阳性细胞数均明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组 GAP-43、NF200 阳性细胞数差异均无统计学意义。

与假手术组比较,干预14 d后,模型组 GAP-43 阳性细胞数明显下调($P<0.05$),NF200 阳性细胞数显著下调($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组、补阳还五汤组 GAP-43 阳性细胞数均显著上调($P<0.01$),两组 NF200 阳性细胞数均明显上调($P<0.05$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组 GAP-43、NF200 阳性细胞数差异均无统计学意义。见表3。

表3 补阳还五汤对大鼠 GAP43、NF200 阳性细胞表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwutang on expression of GAP43 and NF200 positive cells of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$) 个

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	时间 /d	GAP-43 阳性细胞数	NF200 阳性细胞数
假手术组		7	6.3±2.1	5.7±1.2
		14	9.3±2.5	5.7±0.6
模型组		7	0 ¹⁾	0 ²⁾
		14	0.7±0.6 ¹⁾	0.7±0.6 ²⁾
莱菔硫烷组	50	7	10.3±2.5 ⁴⁾	4.0±1.0 ⁴⁾
		14	10.3±2.1 ⁴⁾	4.7±0.6 ³⁾
补阳还五汤组	12.73	7	9.3±0.6 ⁴⁾	3.7±0.6 ³⁾
		14	11.0±2.0 ⁴⁾	4.0±1.0 ³⁾

3.4 对血清中总铁离子与脊髓损伤区域中 GSH、SOD、MDA、GPX4 含量的影响 与假手术组比较,

干预7 d后,模型组血清中总铁离子含量显著升高($P<0.01$),损伤区域脊髓组织中 GPX4 含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组血清中总铁离子含量显著降低、损伤区域脊髓组织中 GPX4 含量显著升高($P<0.01$),补阳还五汤组血清中总铁离子含量、损伤区域脊髓组织中 GPX4 含量差异均无统计学意义;与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组血清中总铁离子、损伤区域脊髓组织中 GPX4 含量差异均无统计学意义。

与假手术组比较,干预14 d后,模型组血清中总铁离子和损伤区域脊髓组织中 MDA 含量显著升高($P<0.01$)、损伤区域脊髓组织中 GPX4、GSH、SOD 含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组、补阳还五汤组血清中总铁离子和损伤区域脊髓组织中 MDA 含量显著降低($P<0.01$)、损伤区域脊髓组织中 GPX4、GSH、SOD 含量显著升高($P<0.01$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组血清中的总铁离子及损伤区域脊髓组织中的 GPX4、GSH、SOD、MDA 含量差异均无统计学意义。见表4和表5。

3.5 对脊髓损伤区 Nrf2、HO-1 的蛋白表达的影响

与假手术组比较,干预7 d后,模型组脊髓损伤区 Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著下调($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组脊髓损伤区 Nrf2、HO-1 蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),补阳还五汤组脊髓损伤区 Nrf2、HO-1 蛋白表达差异均无统计学意义。与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组脊髓损伤区域 Nrf2 蛋白表达差异无统计学意义,补阳还五汤组 HO-1 蛋白表达明显下调($P<0.05$)。

与假手术组比较,干预14 d后,模型组中 Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著下调($P<0.01$);与模型组比

表4 补阳还五汤对大鼠血清中总铁离子与脊髓损伤区域中GPX4含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang on serum total iron ions and contents of GPX4 in spinal cord injury area of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	时间/d	总铁离子/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	GPX4/ng·L ⁻¹
假手术组		7	32.739±4.792	1 163.152±183.686
		14	31.683±3.956	1 425.117±178.798
模型组		7	62.954±8.490 ²⁾	379.915±36.986 ²⁾
		14	96.144±13.852 ²⁾	273.090±70.611 ²⁾
莱菔硫烷组	50	7	47.799±4.755 ⁴⁾	639.396±61.263 ⁴⁾
		14	42.619±2.834 ⁴⁾	755.331±46.075 ⁴⁾
补阳还五汤组	12.73	7	54.609±4.114	515.807±60.083
		14	50.388±5.661 ⁴⁾	615.002±93.966 ⁴⁾

表5 补阳还五汤对大鼠在造模后14 d时GSH、SOD、MDA含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang on serum total iron ions and contents of GPX4 in spinal cord injury area of rats at 14 days post modeling ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
假手术组		17.98±1.28	292.31±32.72	1.50±0.17
模型组		3.97±0.37 ²⁾	59.05±14.71 ²⁾	5.96±0.43 ²⁾
莱菔硫烷组	50	12.32±0.91 ⁴⁾	201.27±20.39 ⁴⁾	2.85±0.26 ⁴⁾
补阳还五汤组	12.73	11.06±0.84 ⁴⁾	181.51±20.25 ⁴⁾	2.51±0.27 ⁴⁾

较,莱菔硫烷组、补阳还五汤组脊髓损伤区Nrf2、HO-1蛋白表达显著上调($P<0.01$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组脊髓损伤区Nrf2、HO-1蛋白表达均明显下调($P<0.05$)。见表6、图2。

表6 补阳还五汤对大鼠脊髓损伤区Nrf2、HO-1的蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Buyang Huanwutang on protein expression of Nrf2 and HO-1 in spinal cord injury area of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	时间/d	Nrf2	HO-1
			/ $\beta\text{-actin}$	/ $\beta\text{-actin}$
假手术组		7	0.762±0.149	0.931±0.025
		14	0.777±0.028	0.846±0.103
模型组		7	0.353±0.033 ²⁾	0.455±0.081 ²⁾
		14	0.223±0.078 ²⁾	0.196±0.07 ²⁾
莱菔硫烷组	50	7	0.529±0.079 ³⁾	0.728±0.109 ³⁾
		14	0.694±0.065 ⁴⁾	0.739±0.124 ⁴⁾
补阳还五汤组	12.73	7	0.425±0.049	0.533±0.098 ⁵⁾
		14	0.487±0.047 ^{4,5)}	0.529±0.102 ^{4,5)}

3.6 对脊髓损伤区域Nrf2、HO-1 mRNA表达的影响 与假手术组比较,干预7 d后,模型组脊髓损伤组织中Nrf2、HO-1 mRNA表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组脊髓损伤组织中Nrf2、HO-1 mRNA表达显著上调($P<0.01$),补阳还五汤组脊髓损伤组织中Nrf2的mRNA表达差异无统计

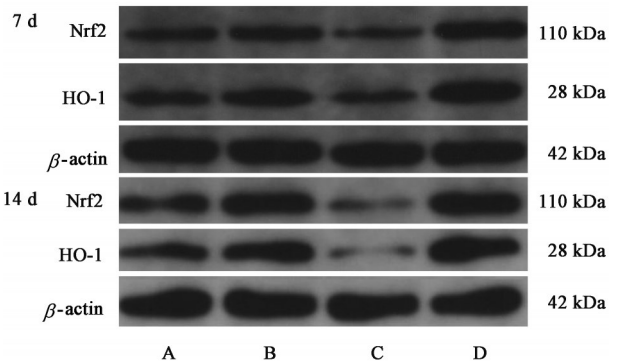


图2 大鼠脊髓损伤组织中Nrf2及HO-1蛋白的表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of Nrf2 and HO-1 proteins in spinal cord injury tissues of rats

学意义,HO-1的mRNA明显上调,差异具有统计学意义($P<0.05$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组脊髓损伤组织中Nrf2的mRNA表达差异无统计学意义,HO-1的mRNA表达明显下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

与假手术组比较,干预14 d后,模型组脊髓损伤组织中Nrf2、HO-1 mRNA表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,莱菔硫烷组、补阳还五汤组脊髓损伤组织中Nrf2及HO-1 mRNA表达显著上调($P<0.01$);与莱菔硫烷组比较,补阳还五汤组脊髓损伤组织中Nrf2、HO-1 mRNA表达明显下调($P<0.05$)。见表7。

表7 补阳还五汤对大鼠脊髓损伤区域Nrf2, HO-1 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Buyang Huanwutang on mRNA expression of Nrf2 and HO-1 in spinal cord injury area of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	时间/d	Nrf2	HO-1
假手术组		7	2.120±0.206	2.201±0.260
		14	2.067±0.224	2.140±0.266
模型组		7	0.810±0.084 ²⁾	0.652±0.065 ²⁾
		14	0.602±0.063 ²⁾	0.485±0.048 ²⁾
莱菔硫烷组	50	7	1.204±0.145 ⁴⁾	1.420±0.148 ⁴⁾
		14	1.723±0.172 ⁴⁾	1.584±0.177 ⁴⁾
补阳还五汤组	12.73	7	1.022±0.111	1.034±0.113 ^{3,5)}
		14	1.405±0.152 ^{4,5)}	1.282±0.149 ^{4,5)}

4 讨论

SCI是一种毁灭性的中枢神经性创伤,会导致运动、感觉和自主神经功能障碍,目前这种复杂的疾病缺乏有效的治疗方法,已逐渐成为一个全球性的问题^[25]。然而,继发性SCI具有一定的可逆性与干预性,且铁死亡参与了继发性SCI的生理病理过程,关于如何调控铁死亡这一过程显然已被业界认为是干预SCI的有效手段^[26]。因此,通过铁死亡调控继发性SCI的治疗手段可能会促进患者的肢体运动功能恢复,提高患者的生活质量。

SCI归属于中医“体惰”“痿证”的范畴。《灵枢·寒热病》:“身有所伤,血出多……若有所堕坠,四支懈惰不收,名曰体惰”;《难经·二十八难》载:“督脉者……起于下极之腧,并于脊里,上至风府,入属于脑”。有学者认为,脊髓与督脉走行一致,其病因和症状与SCI相似^[27]。对于SCI中医四诊合参诊疗,应从气血辩证角度出发,以“益气活血,通络复髓”为治疗大法。补阳还五汤出自于清·王清任来源于《医林改错·下卷·瘫痿论》,主要功效为益气、活血、通络,其在治疗中枢神经性疾病中发挥重要治疗作用。

SCI与铁死亡密切相关,在SCI急性期脊髓内发生大量出血,红细胞聚集、破裂并发生溶血,铁过载和应激反应诱导产生大量ROS,导致不受限制的LPO,MDA是该过程的主要产物,在本实验中,与假手术组比较,造模14d后模型组总铁离子及MDA含量显著上调,说明造模成功,脊髓损伤区域发生了铁死亡^[28]。许卢春等^[8]研究表明,在脊髓损伤中补阳还五汤可通过调节GPX4/ACSL4轴以抑制铁死亡,其机制包含加强GPX4的相对表达,减少促进

不饱和脂肪酸合成的ACSL4相对表达,降低脊髓组织铁含量,减少氧化应激反应,减轻对神经元和髓鞘的继发性损伤。刘英飞等^[29]在脑缺血小鼠模型中发现,补阳还五汤通过提高脑组织的GPX4蛋白和mRNA表达,降低总铁离子水平,减少脂质过氧化,最终通过抑制神经元铁死亡进而发挥抗脑缺血损伤的作用。

总铁离子是铁死亡发生过程中的重要影响因素,在与细胞膜表面的转铁蛋白受体1结合后进入细胞,其中金属还原酶,前列腺六跨膜上皮抗原3将Fe³⁺还原为Fe²⁺,二价金属离子转运蛋白1将Fe²⁺从核内体转运到细胞质,形成一个“不稳定的铁池”^[30],此种铁稳态的异常导致细胞内总铁离子过载发生芬顿反应、哈伯韦斯反应,随后大量羟基自由基积累,催化ROS的生成和积累,进而导致LPO的发生^[31]。

胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白是一种异二聚胱氨酸/谷氨酸反向转运体,该转运体摄入胱氨酸、排出谷氨酸,合成GSH^[32]。当ROS保持稳态平衡时,可调控多种细胞功能,但当其过量积累将导致GSH依赖的脂质过氧化物修复系统受损,抑制半胱氨酸摄取、降低GSH水平^[31]。GSH可抑制LPO,清除自由基,也是GPX4的底物^[33]。GPX4作为一种抗氧化剂,是铁死亡发生的关键调控因子,利用硫醇和硫基将有细胞毒性的磷脂氢过氧化物(PL-PUFA-OOH)还原成无毒的醇类(L-OH),起到阻断脂质过氧化反应链和抑制铁死亡发生的作用,被认为是调控铁死亡的重要靶点^[31,34]。GPX4和GSH协同抑制LPO^[35],GSH水平降低将导致GPX4活性降低,进而导致SOD下降、MDA增加,由GPX4主导催化的还原反应无法将脂质过氧化物代谢掉,最终导致细胞铁死亡。ALIM等^[36]研究发现GPX4及GSH表达下调后铁死亡更容易发生,相反,上调GPX4和GSH的表达则可以在一定程度上抑制铁死亡,印证了上述观点。本研究观察到,与模型组比较,补阳还五汤干预14d后SCI大鼠脊髓组织中GPX4、GSH、SOD含量显著上调,总铁离子含量显著降低,下肢运动功能有所恢复。本实验结果与以往实验结果一致^[28-29],说明补阳还五汤可以通过抑制铁死亡而发挥保护SCI的作用。

Nrf2是碱性亮氨酸拉链(CNC-bZip)转录因子家族成员,具有抗氧化应激以保护细胞的作用,其表达水平影响着氧化应激反应^[37],GPX4是其下游基因之一^[37]。稳态条件下,Nrf2与其特异性受体

Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)结合。Nrf2在受到其激活因子的刺激之后,如ROS修饰Keap1上的半胱氨酸残基,Nrf2释放并稳定,与Keap1解离并转入细胞核与小肌肉腱膜纤维肉瘤(sMAF)蛋白之一形成二聚体,结合抗氧化反应元件(ARE)或Maf蛋白识别元件(MARE)以促进多种细胞保护性和抗氧化基因的表达,包括,启动其下游包括HO-1、NQO1和SOD等相关细胞防御基因的转录诱导^[38-39]。血红素是一种含铁卟啉,是血红蛋白和肌红蛋白、细胞色素和酶等的组成部分,其代谢产物已被证实具有抗炎、抗氧化和抗凋亡活性^[40]。HO-1是血红素代谢的限速酶,Nrf2调控并与铁死亡相关,广泛存在于组织和机体之中,在SCI急性期其表达明显上升,可作为ROS的清除剂,减轻氧化应激反应,分解血红素产生的胆绿素,调控铁蛋白的合成,具有强大的抗氧化作用,同时HO-1产生的一氧化碳可激活细胞内的相关信号通路,从而对铁死亡产生抑制作用^[41]。YANG等^[42]运用西妥昔单抗抑制Nrf2/HO-1信号通路,建立RSL3诱导的铁死亡,并在裸鼠模型中得到进一步证实,说明Nrf2/HO-1是调控铁死亡的关键通路。GE等^[43]使用锌对Nrf2/HO-1和GPX4信号通路进行调控,提高了GPX4、SOD和GSH的含量,降低了MDA和ROS的水平,同时对受损线粒体具有修复作用,降低了炎症因子的水平,有效缓解了脊髓损伤。ZHANG等^[44]使用人参皂苷Rg₁对SCI大鼠进行干预,其结果表明人参皂苷Rg₁可能是通过调节Nrf2/HO-1信号通路发挥抗氧化应激和抗炎效应,从而对保护SCI后受伤的脊髓神经,改善损伤引起的运动功能障碍。上述实验表明,调控Nrf2/HO-1通路具有抗氧化应激反应、抗炎、抑制铁死亡的作用,可修复脊髓损伤、改善损伤后的运动功能。同时对其他模型的相关实验也可佐证Nrf2/HO-1通路对铁死亡后神经损伤的重要性,CHEN等^[45]研究观察到,对大脑中动脉闭塞再灌注小鼠模型进行铁死亡抑制剂干预后,损伤脑组织中心Nrf2、HO-1 mRNA水平和蛋白表达显著提高,进而改善脑梗死面积和神经功能损伤,抑制缺血性中风引起的受损海马体中受伤脑组织中心的氧化应激反应和炎症反应,体外实验也证明,干预药物是通过Nrf2通路发挥上述作用的。刘健等^[46]通过体外实验研究发现,通过Nrf2/HO-1/xCT/GPX4轴原花青素B₂可显著增强抗氧化基因的表达和细胞的抗氧化能力,减轻对神经细胞的损伤和少突胶质细胞的铁死亡,最终对中枢神经系统炎性变性疾病

发挥一定治疗作用。

在本研究中,与模型组比较,干预7 d后补阳还五汤组脊髓组织中Nrf2、HO-1的蛋白表达和Nrf2 mRNA表达差异无统计学意义,HO-1 mRNA表达明显上调;干预14 d后,补阳还五汤组Nrf2、HO-1的蛋白表达和mRNA表达均显著上调,此结果与上述实验基本一致^[45-46],说明补阳还五汤对脊髓神经细胞铁死亡的抑制作用和对SCI的修复作用可能是通过上调Nrf2、HO-1信号通路而实现的,发挥此作用的具体时间曲线需等待进一步研究。

神经元轴突是传递生物信号的重要组成部分,脊髓损伤后轴突无法正常传递信号,导致患者运动功能无法完全恢复,虽然中枢神经系统具有再生性和可塑性,但SCI后的微环境容易对其再生造成不利影响^[47-48],可通过调控神经再生相关蛋白的表达以促进神经元再生。NF200是一种特征性细胞骨架蛋白,具有维持神经轴突稳定的功能,是构成轴突的重要结构蛋白^[49]。GAP-43是一种在神经元发育和突触发生过程中高表达的突触前蛋白,参与了轴突生长、突触重塑和调节学习记忆功能,与轴突生长关系密切,是轴突连接的特异性蛋白^[50]。研究表明,NF200、可GAP-43可作为反映轴突再生及神经元修复的标志性蛋白,增加此二者的表达可促进神经元再生^[51]。孙海涛等^[52]通过体外实验发现,外胚层间充质干细胞来源的细胞外囊泡(EMSC-EVs)促进细胞培养后GAP-43和NF200的蛋白和mRNA表达,进而促进SCI后神经轴突的再生和伸长。蒋昇源等^[53]通过体内实验,发现携载中药提取物川芎嗪水凝胶能够上调NF200蛋白表达,神经元轴突的恢复和再生,从而改善行为学和组织形态学结构。在本实验中,与模型组比较,干预7、14 d后补阳还五汤组能够促进脊髓组织中NF200、GAP-43阳性细胞表达,改善神经元细胞结构形态及促进下肢运动功能的恢复,由此可知,补阳还五汤对SCI大鼠神经元细胞和轴突的再生具有积极作用。

本研究不足之处在于,检测方法不足,仅对Nrf2、HO-1进行了Western blot和Real-time PCR检测,未进行免疫组化检测,对GPX4未进行Western blot和免疫组化检测;检测指标不足,未对相关指标如ACSL4、SLC7A11、亚铁离子进行检测,后续将进一步探索以支撑结论,同时也期待业内同道对此方向开展实验以相互论证。

综上所述,补阳还五汤可通过调控Nrf2/HO-1信号通路抑制血清中总铁离子和上调脊髓组织中

GPX4、GSH、SOD、Nrf2、HO-1的表达,下调MDA的表达,促进GAP-43、NF200的阳性细胞表达,改善神经元细胞病理学结构形态,进而抑制铁死亡,促进神经元轴突再生及改善下肢运动功能障碍,这可能是补阳还五汤保护SCI的作用机制之一。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] AHUJA C S, NORI S, TETREAUULT L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017,80(3S):S9-S22.

[2] GBD Spinal Cord Injuries Collaborators. Global, regional, and national burden of spinal cord injury, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22(11):1026-1047.

[3] HU X, XU W, REN Y, et al. Spinal cord injury: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):245.

[4] 李宗洋,张俐. 活血通督汤修复脊髓损伤的机制研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(6):2743-2746.

LI Z Y, ZHANG L. Research progress on the mechanism of Huoxue Tongdu decoction in repairing spinal cord injury[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(6):2743-2746.

[5] TANG R, BOTCHWAY B, MENG Y, et al. The inhibition of inflammatory signaling pathway by secretory leukocyte protease inhibitor can improve spinal cord injury[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(7):1067-1073.

[6] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-1072.

[7] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266-282.

[8] 许卢春,姜国正,马昱堃,等. 基于GPX4-ACSL4轴探讨补阳还五汤抑制铁死亡促进脊髓损伤后神经功能恢复的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(5):20-30.

XU L C, JIANG G Z, MA Y K, et al. Mechanism of Buyang Huanwutang in inhibiting ferroptosis and enhancing neurological function recovery after spinal cord injury via GPX4-ACSL4 axis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(5):20-30.

[9] 幸佳佳,魏娟芳,朱莉,等. 脊髓损伤后神经元铁死亡的分子调控机制及应用研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2022, 32(12):1133-1138.

XING J J, WEI J F, ZHU L, et al. Advances in molecular regulation and application of neuronal ferroptosis in spinal cord injury [J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2022, 32(12):1133-1138.

[10] ZHANG S, XU J, SI H, et al. The role played by ferroptosis in osteoarthritis: Evidence based on iron dyshomeostasis and lipid peroxidation [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(9):

1668.

[11] 祁晨旭,杜开颜,曹静钰,等. 艾灸对脊髓损伤后尿潴留大鼠脊髓组织脂质氧化的影响[J]. *针刺研究*, 2025, 50(4):419-425.

QI C X, DU K Y, CAO J Y, et al. Effect of moxibustion on lipid peroxidation in the spinal cord of rats with urinary retention due to spinal cord injury[J]. *Acupunct Res*, 2025, 50(4):419-425.

[12] IQBAL M J, KABEER A, ABBAS Z, et al. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):7.

[13] 揣强,翟文静,贾苏杰,等. 基于Nrf2/SLC7A11/GPX4通路探究泄浊解毒方通过抑制铁死亡和缓解肠黏膜损伤治疗溃疡性结肠炎的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(1):160-169.

CHUAI Q, ZHAI W J, JIA S J, et al. Based on Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway, mechanism of Xiezhuo Jiedu prescription in treatment of ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis and alleviating intestinal mucosal injury was studied [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(1):160-169.

[14] ZHANG Y, WU Q, LIU J, et al. Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152:113273.

[15] BENEDICT A L, MOUNTNEY A, HURTADO A, et al. Neuroprotective effects of sulforaphane after contusive spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(16):2576-2586.

[16] 李旭,杨阳. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓功能修复及gp130、IL-6的影响[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(10):2350-2353.

LI X, YANG Y. Effects of Buyang Huanwu decoction on spinal cord function repair and gp130, IL-6 in rats with spinal cord injury [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(10):2350-2353.

[17] 卜献忠,卜保献,张冠鹏,等. 补阳还五汤保护急性脊髓损伤的网络药理学分析[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2024, 26(2):375-389.

BU X Z, BU B X, ZHANG G P, et al. Network pharmacological analysis of Buyang Huanwu decoction in protecting acute spinal cord injury [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2024, 26(2):375-389.

[18] 卜献忠,张冠鹏,郭晓辉,等. 基于mTOR通路介导的自噬探讨补阳还五汤对脊髓损伤的保护机制[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(4):778-783.

BU X Z, ZHANG G P, GUO X H, et al. Investigating the protective mechanisms of Buyang Huanwu decoction against spinal cord injury via mTOR pathway-mediated autophagy [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(4):778-783.

[19] 胡友鹏. 基于AKT/Nrf2/GPX4信号通路探讨黄芪注射液抑制铁死亡干预脊髓损伤的作用机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2024.

HU Y P. Exploring the mechanism of *Astragalus membranaceus* injection inhibiting ferroptosis to intervene in

- spinal cord injury based on Akt/Nrf2/GPX4 signaling pathway [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [20] 陈娟, 暴军, 张颖, 等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织铁转运相关蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5231-5236.
CHEN J, BAO J, ZHANG Y, et al. Effects of Buyang Huanwu decoction on iron transport-related proteins in brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(11): 5231-5236.
- [21] 陶经纬, 周婧雅, 刘奕扬, 等. 川芎嗪对脊髓损伤大鼠 Nrf2/HO-1 通路及氧化应激的调控作用[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2575-2581.
TAO J W, ZHOU J Y, LIU Y Y, et al. Effects of tetramethylpyrazine on Nrf2/HO-1 pathway and oxidative stress in spinal cord injury rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(5): 2575-2581.
- [22] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004 (9): 1069-1072.
HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion between animals and between animals and humans in pharmacological experiments [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004(9): 1069-1072.
- [23] 申科律, 郭维潇, 徐龙, 等. 人参皂苷 Rg₁ 通过 LncRNA MALAT1 相关通路对脊髓损伤后神经再生修复的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 184-187, 293.
SHEN K L, G W X, XU L, et al. Effect of ginsenoside Rg₁ on nerve regeneration and repair after SCI via LncRNA MALAT1-related pathway [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(4): 184-187, 293.
- [24] 周雨昕, 马勇, 吴承杰, 等. 基于 NLRP3 炎症小体途径探究脊髓康促进脊髓损伤大鼠修复的机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5385-5389.
ZHOU Y X, MA Y, WU C J, et al. Mechanism of Jisui Kang in promoting the repair of spinal cord injury rats based on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(9): 5385-5389.
- [25] LIMA R, MONTEIRO A, SALGADO A J, et al. Pathophysiology and therapeutic approaches for spinal cord injury [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13833.
- [26] WANG Z, WU Z, XIE Z, et al. Metformin attenuates ferroptosis and promotes functional recovery of spinal cord injury [J]. World Neurosurg, 2022, 167: e929-e939.
- [27] 齐英娜, 吴鑫杰, 王延雷, 等. 从督论治脊髓损伤的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1425-1427.
QI Y N, WU X J, WANG Y L, et al. Research advances in treating spinal cord injury from the perspective of governor vessel theory [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(6): 1425-1427.
- [28] DERRY P J, VO A, GNANANSEKARAN A, et al. The chemical basis of intracerebral hemorrhage and cell toxicity with contributions from eryptosis and ferroptosis [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 603043.
- [29] 刘英飞, 陈博威, 田丰铭, 等. 补阳还五汤通过 Cav-1 抑制铁死亡对脑缺血小鼠的神经保护作用 [J]. 中成药, 2024, 46(2): 605-610.
LIU Y F, CHEN B W, TIAN F M, et al. Neuroprotective effects of Buyang Huanwu decoction against cerebral ischemia via Cav-1-mediated ferroptosis inhibition in mice [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(2): 605-610.
- [30] ZHAO Q, LIU F, ZHOU B, et al. Ferroptosis: A novel therapeutic direction of spinal cord injury [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 7906218.
- [31] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88.
- [32] 黄肖玲. 基于 Nrf2/HO-1 通路探讨大株红景天注射液抑制铁死亡改善小鼠 HT22 海马神经元缺氧复氧损伤 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
HUANG X L. Sofren injection protects against ferroptosis in HT22 cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation based on Nrf2/HO-1 signaling pathway [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [33] CHEN X, LI J, KANG R, et al. Ferroptosis: Machinery and regulation [J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [34] SHIMADA K, SKOUTA R, KAPLAN A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(7): 497-503.
- [35] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: The role of ferroptosis in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(5): 280-296.
- [36] ALIM I, CAULFIELD J T, CHEN Y, et al. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke [J]. Cell, 2019, 177(5): 1262-1279.
- [37] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Redox Biol, 2019, 23: 101107.
- [38] GONG F, GE T, LIU J, et al. Trehalose inhibits ferroptosis via NRF2/HO-1 pathway and promotes functional recovery in mice with spinal cord injury [J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(7): 3216-3232.
- [39] O'ROURKE S A, SHANLEY L C, DUNNE A. The Nrf2-HO-1 system and inflammaging [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1457010.
- [40] CAMPBELL N K, FITZGERALD H K, DUNNE A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1 [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(7): 411-425.
- [41] LIU W, TAN Z, ZHAO Y, et al. Panaxadiol saponin ameliorates ferroptosis in iron-overload aplastic anemia mice and Meg-01 cells by activating Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 110131.
- [42] YANG J, MO J, DAI J, et al. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling

- pathway in KRAS mutant colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11):1079.
- [43] GE M H, TIAN H, MAO L, et al. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(9):1023-1040.
- [44] ZHANG Z, YANG K, MAO R, et al. Ginsenoside Rg₁ inhibits oxidative stress and inflammation in rats with spinal cord injury via Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neuroreport*, 2022, 33(2):81-89.
- [45] CHEN Y, HE W, WEI H, et al. Srs11-92, a ferrostatin-1 analog, improves oxidative stress and neuroinflammation via Nrf2 signal following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(6):1667-1677.
- [46] 刘健, 陈莹, 梁亚杰, 等. 原花青素 B2 通过 NRF2/HO-1/xCT/GPX4 轴抑制氧化应激减轻 H₂O₂ 诱导的人少突胶质细胞的损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(9):1735-1743.
- LIU J, CHEN Y, LIANG Y J, et al. Proanthocyanin B2 inhibits oxidative stress and alleviates H₂O₂-induced damage to human oligodendrocytes through NRF2/HO-1/xCT/GPX4 axis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(9):1735-1743.
- [47] 杨林, 邹瑶, 周宾宾. 受损脊髓神经轴突再生过程中 Nogo-A/ NgR 及 NGF/TrkA 信号通路的交互作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(20):3220-3224.
- YANG L, WU Y, ZHOU B B. Interaction of Nogo-A/ NgR signaling pathway and NGF/TrkA signaling pathway during the regeneration of injured spinal cord nerve axons [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(20):3220-3224.
- [48] 魏嵩, 高峰, 刘俊, 等. 脊髓损伤后居家康复的研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2021, 27(2):177-181.
- WEI S, GAO F, LIU J, et al. Advance in home-based rehabilitation after spinal cord injury (review) [J]. *Chin J Rehabil Theory Pract*, 2021, 27(2):177-181.
- [49] GAGLIARDI D, MENERI M, SACCOMANNO D, et al. Diagnostic and prognostic role of blood and cerebrospinal fluid and blood neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis: A review of the literature [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17):4152.
- [50] WATSON D C, BAYIK D, STOREVIK S, et al. GAP43-dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity [J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(5):648-664.
- [51] WEI J, SU W, ZHAO Y, et al. Maresin 1 promotes nerve regeneration and alleviates neuropathic pain after nerve injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):32.
- [52] 孙海涛, 任春朋, 杨永涛, 等. 外胚层间充质干细胞来源细胞外囊泡促进神经元轴突的伸长 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(23):4924-4930.
- SUN H T, REN C P, YANG Y T, et al. Ectomesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles promote neuronal axonal elongation [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2025, 29(23):4924-4930.
- [53] 蒋昇源, 邓博文, 刘港, 等. 携载川芎嗪缓释微粒导电水凝胶修复脊髓损伤实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2023, 37(1):65-73.
- JIANG S Y, DENG B W, LIU G, et al. Experimental study on the repair of spinal cord injury by conducting hydrogel loaded with tetramethylpyrazine sustained-release microparticles [J]. *Chin J Repair Reconstr Surg*, 2023, 37(1):65-73.

[责任编辑 王鑫]